

Литература:

1. Забаровская З. В. Основные принципы лечения инсулинзависимого сахарного диабета // Медицинские новости. – 1999. – 8. – С. 25 – 29.
2. Скоромец А. А., Бараневич Е. Р., Петрова Н. Н., Мельникова Е. В. Комплексная оценка эффективности лечения диабетической энцефалопатии // Журнал неврологии и психиатрии. - 2002, №1. - С. 30 - 32.
3. American Diabetes Association Ad Hoc Expert Committee. Prevention of type I diabetes mellitus // Diabetes Care. - 1990.
4. Calles-Escandon J., Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective // Endocrine Reviews. – 2001, Vol. 22 (1). – P. 36-52.
5. Stehouwer C. D., Lambert J., Donker A. J., van Hinsberg V. W. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy - Cardiovascular Res. – 1997. - Vol. 34. - P. 55 - 68.
6. Vanhoutte P. M. Endothelial dysfunction and vascular pathology. - Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg. – 2006. - V. 161 (10-12). - P. 529 - 536.

ТИАМИН ИНГИБИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ДИТИРОЗИНА И НИТРОТИРОЗИНА, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИНИТРИТА НА ТИРОЗИН

Степура А.И., Адамчук Р.И., Опарин А.Ю., Степура И.И.

ГУ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»

Оксид азота (NO) участвует в реализации многих физиологических функций включая расслабление гладкомышечной мускулатуры, ингибирование активации тромбоцитов, нейротрансдукции и иммунный ответ.

В дополнение к физиологическим функциям, оксид азота также вовлечён в развитие патологических состояний, сопровождающихся воспалительными процессами: включая артрит, миокардит, колиты и нефриты, а также, рак, диабет и нейродегенеративные заболевания. Токсические эффекты оксида азота связаны главным образом с повышенным содержанием пероксинитрита, который образуется в биологических системах вследствие взаимодействия оксида азота с супероксидом в быстрой практически диффузионно-контролируемой реакции.

Пероксинитрит способен модифицировать целый ряд, как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений присутствующих в биологических системах. Пероксинитрит взаимодействует с тирозином, триптофаном, цистеином, метионином, нуклеиновыми кислотами, мембранными липидами.

Пероксинитрит существует как в протонированной форме, так и в форме аниона.

Гидроксильные радикалы, диоксид азота, на которые распадается пероксинитрит в протонированной форме, окисляют тирозинильные остатки белков и ферментов до соответствующих тирозинильных радикалов, которые образуют дитирозин и межбелковые дитирозинильные сшивки, что сопровождается инактивацией белков и ферментов. Многие из низкомолекулярных соединений, таких как аскорбиновая кислота, особенно глутатион и цистеин эффективно взаимодействуют с пероксинитритом, снижают его токсические эффекты.

Однако водорастворимые антиоксиданты не способны полностью обеспечить защиту клеточных структур от повреждающего действия пероксинитрита и его свободно-радикальных продуктов распада. Это связано с тем, что протонированная форма пероксинитрита, диоксид азота легко растворяются в гидрофобных компонентах клеточных мембран, проникают в гидрофобные области белков. Поэтому весьма важно для нормального функционирования клеток, наличие в достаточном количестве в клеточных мембранах эффективных гидрофобных антиоксидантов, способных инактивировать не только активные формы кислорода, но и активные формы азота.

Широко применяемые в настоящее время соединения — антиоксиданты, не обеспечивают эффективную защиту сердечно-сосудистой системы от повреждения при окислительном стрессе. Исследования, проведенные более чем на 200.000 пациентов показали, что такие классические витамины-антиоксиданты как α -токоферол, β -каротин, практически бесполезны в предотвращении сердечно-сосудистых заболеваний. Структурные особенности молекулы тиамин обеспечивают существование в нейтральной среде нескольких его минорных форм, находящихся между собой в равновесии. Минорная трициклическая форма тиамин легко окисляется в тиохром, растворимость которого в гидрофобной среде примерно в 100 раз выше, нежели растворимость тиамин. Мы предполагаем, что при совместном воздействии тиамин и его гидрофобные метаболиты ингибируют реакции нитрования белков и ферментов, как в водных, так и в гидрофобных средах и, следовательно, защищают обладающие гетерогенностью биологические системы от повреждения.

Как известно, тиамин его фосфорные эфиры играют важную роль в функционировании нервных клеток, а также функционировании сердечно-сосудистой системы. Например, дефицит тиамин при продолжительном окислительном стрессе, сопровождающийся генерацией активных форм кислорода, приводил к избирательному повреждению нейронов.

Предполагается, что при тиаминовой недостаточности наблюдается избирательная индукция eNOS (а не iNOS), что является ключевым

фактором, ведущим к развитию окислительного стресса, образованию токсичного пероксинитрита, повреждению и гибели нейронов.

Ранее было показано, что под действием пероксинитрита тиамин окисляется с образованием гидрофобных продуктов тioxрома и оксодигидротioxрома, которые являются эффективными ловушками пероксинитрита.

Тиамин инактивирует тирозильные радикалы, ингибирует образование дитирозина и межбелковых сшивок, в реакциях катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина.

В данной работе мы исследовали ингибирование тиамином и тioxромом образования дитирозина и 3-нитротирозина, полученных при воздействии пероксинитрита на тирозин.

Мы показали, что тирозинильные радикалы окисляют тиамин в тioxром, а затем тioxром в оксодигидротioxром, который устойчив к действию тирозинильных радикалов и не испытывает дальнейших превращений. Тиамин, тioxром, оксодигидротioxром ингибируют нитрование тирозина пероксинитритом, уменьшают выход 3-нитротирозина

Материалы и методы исследования. В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминдифосфат (ТДФ), тioxром, и сывороточный альбумин человека фирмы Сигма (США). Аминокислоты: L- и D-тирозин. Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси. Концентрацию пероксида водорода определяли, добавляя к раствору избыток иодида калия и затем регистрируя образование молекулярного иода спектрофотометрически.

Пероксинитрит синтезировали из пероксида водорода и нитрита натрия смешиванием их эквимольных количеств, как описано ранее. После остановки реакции ледяным NaOH, собирался верхний слой раствора, и определялась концентрация пероксинитрита по поглощению на 302 нм ($\epsilon=1670 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Образование нитротирозина или остатков нитротирозина в составе молекулы САЧ после воздействия пероксинитрита на водные растворы тирозина или белка регистрировали спектрофотометрически, образование дитирозина измеряли флуоресцентным методом.

Спектры поглощения регистрировались при помощи спектрофотометров Specord M-40, Specord M-500 (Германия), спектры флуоресценции регистрировались при помощи спектрофлуориметров Aminco-Bowman (США) и SFL 1211a (Беларусь).

Результаты и их обсуждение. После добавления пероксинитрита к водному раствору тирозина наблюдали образование 3-нитротирозина и дитирозина. 3-Нитротирозин обладает характерным поглощением с максимумом 428-430 нм в нейтральной или щелочной средах. Дитирозин имеет длинноволновой максимум при 315 нм и обладает интенсивной

флуоресценцией с максимумом при 410 нм, что позволяет регистрировать даже малые концентрации в растворе. С увеличением концентрации тирозина в растворе выход дитиروزина возрастает, а выход нитротирозина уменьшается. При высоком содержании тирозина в растворе 2 мМ и выше наблюдали, для данной концентрации пероксинитрита, практически полное ингибирование образования 3- нитротирозина. При этих условиях в растворе образуется практически только дитирозин.

Тиамин и тиохром защищали тирозин или тирозин в составе сывороточного альбумина человека от модификации пероксинитритом. Выход 3-нитротирозина уменьшался при увеличении концентрации тиамин в растворе.

После воздействия пероксинитрита на водные растворы тирозина в смеси с тиамином, происходит также окисление тиамин. Продукты окисления тиамин обладают поглощением с максимумом при 345-350 нм. Декомпозиция спектра поглощения продуктов окисления тиамин под действием пероксинитрита, показывает, что поглощение в области 345-350 нм обусловлено практически оксидигидротиохромом.

Мы показали, что только высокие концентрации тиамин, в 22 раза превышающие концентрацию тирозина, вызывают снижение выхода 3-нитротирозина на 50%. Следовательно, константа скорости реакции взаимодействия пероксинитрита с тирозином примерно в 22 раза выше, чем кажущаяся константа скорости взаимодействия пероксинитрита с тиамином (табл. 1).

Таблица 1- Ингибирование образования 3-нитротирозина и дитиروزина в присутствии тиамин и возрастание выхода оксидигидротиохрома при увеличении концентрации тиамин в растворе. Концентрация тирозина - $2,43 \cdot 10^{-4}$ М, концентрация пероксинитрита - $2 \cdot 10^{-4}$ М рН 7,0 фосфатный буфер.

Состав раствора	Концентрация тиамин, мкМ	Концентрация 3- нитротирозина, мкМ	Концентрация оксидигидротиохрома, мкМ	Концентрация дитиروزина, мкМ
D-тир + OONO	-	19,3	-	24,0
D-тир + Т + OONO	97,5	19,0	0,125	23,2
D-тир + Т + OONO	243,9	18,1	0,36	21
D-тир + Т + OONO	487,8	18,0	0,375	17,3
D-тир + Т + OONO	975,6	17,0	1,12	13
D-тир + Т + OONO	2439	16,3	2,17	10,7
D-тир + Т + OONO	4878	11,8	3,19	

В тоже время, даже низкие концентрации тиохрома составляющие меньше 5% от концентрации тирозина, оказывают защитный эффект и снижают выход 3-нитротирозина. Мы определили, что эффективность тиохрома, как ингибитора реакции нитрования тирозина примерно в 50 раз выше, нежели тиамин. Мы показали, что константа скорости взаимодействия пероксинитрита с тиохромом в 50 раз выше, нежели константа скорости взаимодействия тиамина с пероксинитритом. Низкая эффективность тиамина связана с малым содержанием трициклической и тиольной форм тиамина в водном растворе при нейтральном значении pH среды. Концентрация тиольной формы тиамина при pH 7,5, согласно уравнению Гендерсона-Хассельбаха, равна 2,0 % от общей концентрации тиамина в растворе. Согласно нашим оценкам концентрация трициклической формы тиамина (pH 7,5) также примерно составляет 2,0 % от общей концентрации тиамина в растворе. Содержание трициклической формы при нейтральном значении pH было наиболее высоким для тиамина и уменьшалось в случае фосфорных эфиров тиамина ТМФ и ТДФ.

Методом иммуноферментного анализа, было показано возрастание уровня нитротирозина при экспериментальной тиаминовой недостаточности.

Эндотелиальный оксид азота, или путём наработки токсичных производных (пероксинитрит), или путём ингибирования цитохром с оксидазы (и митохондриального дыхания с последующей генерацией активных форм кислорода и азота) может являться фактором патогенеза нейрональных повреждений при синдромах возникающих из-за недостатка тиамина, включая энцефалопатию у людей.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой способности тиохрома ингибировать нитрование тирозина и тирозинильных остатков белков. Тиохром может явиться эффективным средством для предотвращения нейрональных и сосудистых повреждений при воспалительных процессах.

Литература:

1. Stepuro I.I. Thiamine and vasculopathies Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids.- 2005.-vol. 72.-P. 115-127.
2. Степура А.И., Адамчук Р.И., Опарин А.Ю., Степура И.И. Тиамин ингибирует образование дитирозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина // Биохимия. -2008. в печати
3. Ignaro L.J., Cirino G., et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol.-1999. -Vol. 34.- P. 879-886.
4. R.E. Huie and S.Padmaja. Free Radical Res.-1993.-Commun. 18.- P. 195-199.
5. Radi R. et al. The biological chemistry of peroxynitrite In Nitric Oxide Biology and Pathobiology (Ignaro L. J., ed.) // Academic Press.-2000.-P. 57-82.
6. Schopfer F.J., Baker P.R., Freeman B.A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? // Trends Biochem Sci.-2003.-v. 28.- P. 646-654.

7. Radi R. et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls // J/Biol Chem.-1991.-266.-P. 4244-4250.
8. Tanphaichitr, V. in Handbook of vitamins (Rucker, R., Suttie, J. ed.), Marcell Dekker, N.Y. -2001.-P. 275-316.
9. Calingasan, N.Y., Chun, W.J., Park, L.C., Uchida, K., Gibson, G.E. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency // J. Neuropathol. Exp. Neurol.-1999.-58. -P. 946-958.
- 10.A. Henglein, C. Kormann. Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem.-1985.-Med. 48 (2).-P. 251-258.
- 11.Uppu R.M., Pryor W.A. Biphasic synthesis of high concentrations of peroxynitrite using water-insoluble alkyl nitrite and hydrogen peroxide // Methods Enzymol.-1996.-Vol. 269.-P. 322-329.
- 12.J.S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J.P. Crow. Oxidative chemistry of peroxynitrite // Methods Enzymol. -1994.-Vol. 233.-P. 229-240.

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ IN VITRO В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОКСИГЕНИРОВАННОСТИ КРОВИ

Степура Т.Л., Зинчук В.В.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Беларусь*

Оксид азота (NO) наиболее известен как фактор регуляции тонуса сосудов, нейротрансмиттер, агент, образующийся в макрофагах для обеспечения защитных функций организма. Гемоглобин (Hb) в отношении NO рассматривают в качестве инактиватора или транспортной формы последнего [Sonveaux P. et al., 2007]. Предполагается также, что NO может выполнять функцию аллостерического регулятора кислородсвязывающих свойств гемоглобина [Stepuro T.L., Zinchuk V.V., 2006]. Исходя из выше изложенного, была поставлена цель оценить влияние доноров оксида азота на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) *in vitro* в условиях различного насыщения крови кислородом.

Материалы и методы. Во всех экспериментах использовалась смешанная венозная кроличья кровь ($n=9$). В первой серии опытов кровь инкубировали 30 минут при 37 °С в анаэробных условиях с нитрозоцистеином (Cys-SNO) и S-нитрозо-N-ацетилпенициламином (SNAP) в концентрационном соотношении гемоглобина (тетрамера) и образующегося из донора NO 1:1. Во второй серии опытов образцы крови инкубировали с Cys-SNO, SNAP и диэтиламин-NO (DEANO) при соотношении NO и гемоглобина (тетрамера) равном 1:2. Изначально донор добавляли в сатуратор, где происходило насыщение крови